

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37104
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659164
 研究課題名（和文）幹細胞走化因子を用いた組織内自己幹細胞の遊走刺激による脳組織再生
 研究課題名（英文）The brain regeneration using chemotactic stimulation with favorable chemoattractant factor for autologous tissue stem cells
 研究代表者
 伊藤 貴彦（ITO TAKAHIKO）
 久留米大学・医学部・講師
 研究者番号：20309842

研究成果の概要（和文）：脳組織の再生を自己組織内にある幹細胞を障害を受けた部位に誘導し、障害部位に埋め込んだ足場で増殖・分化させることで脳を再生することを目的とした。幹細胞を足場へ誘導するための走化因子を多数組み合わせることで、効率的な細胞の誘導を得られる組み合わせをいくつか発見した。またこれら走化因子を長期間に渡り放出するシステムの開発も行った。足場は組織親和性が高いと言われるポリマーを用いて細胞が生着できそうな孔を有するものを作成できたが、毒性が強いため細胞を増殖させることはできなかった。改良を加え徐々に毒性が低下してきた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is for regeneration of brain tissue using stem cell migration from undamaged tissue to damaged tissue, that has been implanted high affinity scaffold. We made chemoattractant cocktail for stem cell migration. We confirmed that the cocktail accelerated stem cells migration. And we fabricated nano particles, which can release chemotactic factor long lasting, over 42 days. Finally, we fabricated scaffold. Although the scaffold had appropriate pore size for cell adhesion and growing, scaffold materials had cytotoxicity against stem cells. Cytotoxicity has been improving.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：再生医学、走化因子、遊走能

- 研究開始当初の背景
(1) 脳虚血障害において、治療のターゲットとなるペナンプラ領域などへの治療

戦略として神経幹細胞あるいは胚性幹細胞由来の細胞移植、骨髄間質細胞等の非神経系細胞移植による分化転換な

どが挙げられるが、移植細胞の標的部
位への生着、分化制御は未だ満足す
べきものではない。

- (2) 移植幹細胞のより効果的な生着・増殖・
分化を誘導するためには、神経幹細胞を
移植するだけでなく組織内自己幹細胞
の障害領域への遊走を促す事で生着・分
化率を上昇させることが出来るのではな
いかと考えた。
- (3) 幹細胞の遊走に影響を与える走化因子に
関しては PDGF、FGF、VEGF や IL-8 など
が遊走を加速させる事をすでに確認し
ている。更に、パイロットスタディとし
てそれら走化因子を PLGA を素に
double emulsion method を用いて作製し
た microsphere に組み込み走化因子の
放出実験を行い、幹細胞の遊走に必要な
濃度の走化因子の放出を確認した。
- (4) 脳組織だけではなく組織再生は自己幹細胞
を用いた方法がここ見られているが、
足場と自己正常組織との integration が
しばしば問題となる。その integration
を正常に構築するためには足場だけの
細胞の分化増殖のみならず、正常組織
からの細胞を足場に誘導することが強固な
integration を構築できると考えた。

2. 研究の目的

脳梗塞により障害を受けた脳の機能を
回復させる為に幹細胞移植による脳組
織の再生が試みられているが、より効
率的な幹細胞移植をおこなう為に幹細胞
を移植するだけでなく組織内自己幹細胞
の遊走を促し、障害部位へ誘導し生
着・増殖・分化しやすい環境を構築する
事が必要である。組織に足場を組み込む
事で組織の再生を促す報告は多数ある
が、未だ確立したものは無く更には自己
細胞を組織内へ遊走させることで再生
を試みる報告は国内外とも現在の所存
在しない。本研究は脳組織に対して親
和性の高い素材をもとに作製した足場
に幹細胞の遊走を刺激する走化因子を
長期にわたり放出できる microsphere
を組み込むことで、自己幹細胞を高率に
足場に遊走・接着させ脳組織を再生させ
る事を目的としている。本研究が実用
的なものとなれば、脳組織だけではなく
再生が困難臓器への応用が可能となり、
その可能性は大きくなる。

3. 研究の方法

- (1) 培養された幹細胞を用い migration

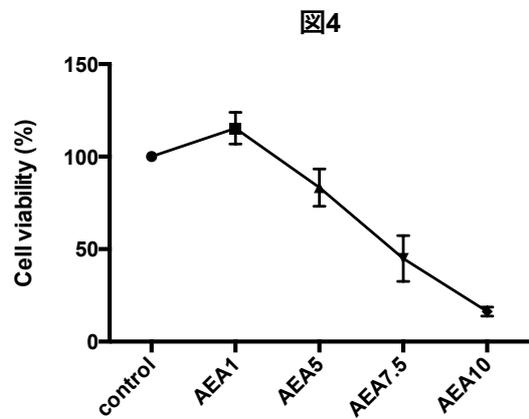
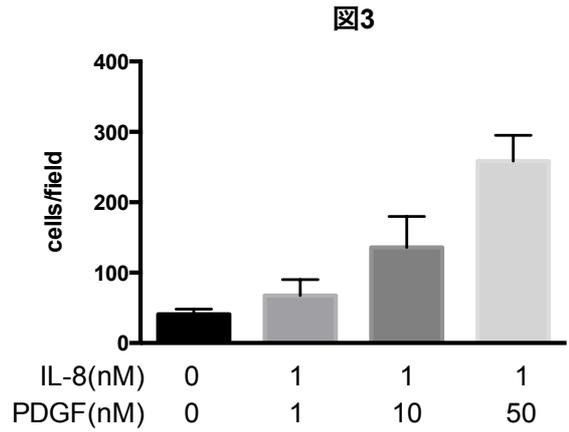
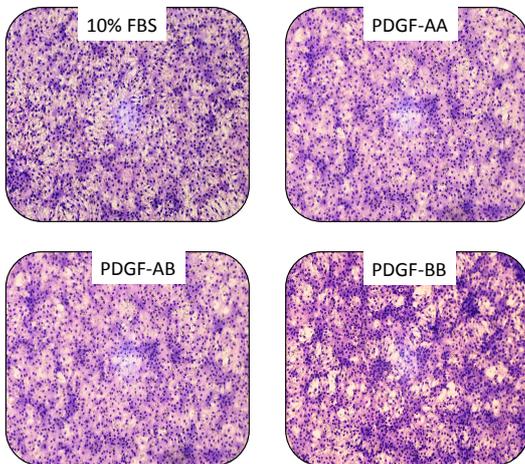
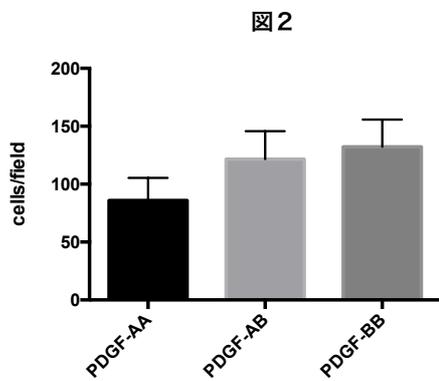
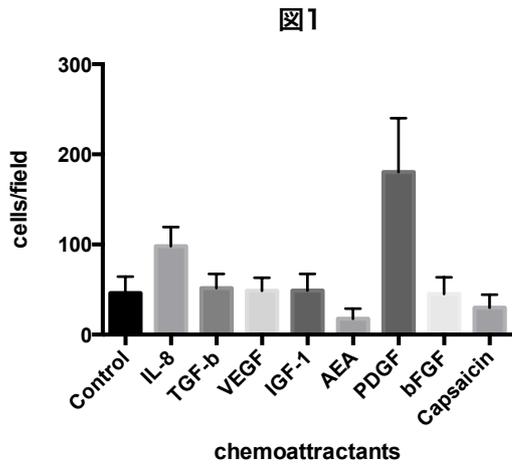
assay を行い、より効果的な走化因子の
組み合わせを決定する。対象は IL-8、
TGF- β 、VFGF、IGF-1、anandamide、
PDGF (AA, AB, BB)、bFGF とした。

Migration assay は Boyden chamber を
用いて行う。Chamber 内での培養は 24
時間行い、余剰細胞を拭いとったあと
Diff Quick を用いて染色し遊走した細胞
を顕微鏡下に数える。

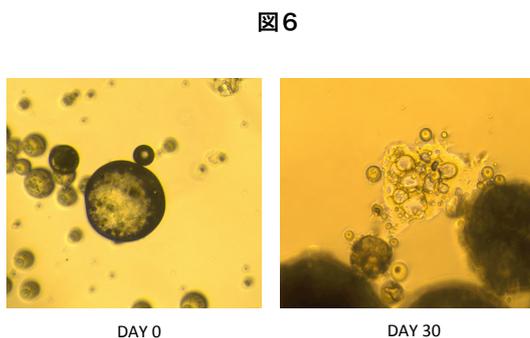
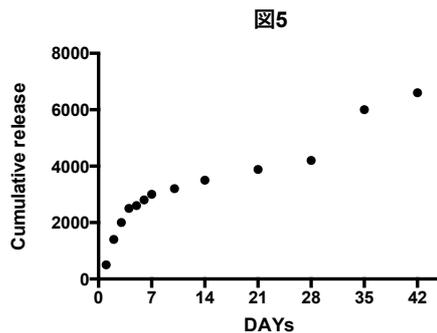
- (2) PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid))
を素材に double emulsion method を用
いて microsphere を作成し、その中
に走化因子を組み込み培養液中での走化
因子の放出能を測定する。同時に細胞
と共培養し、細胞毒性を確認する。
Microsphere の放出能の試験は BSA を
組み込み作成した microsphere を培養
液中に添加し、はじめの 7 日までは毎
日培養液を回収し、それ以降は 7 日ご
とに回収し、回収培養液中の BSA 濃度
を測定し、累積放出量を算出する。形
態的变化は培養液中の microsphere の
中でターゲットをいくつか決めてそれ
ぞれについて、毎日顕微鏡下に観察す
る。
- (3) PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid))
を用いて足場を作成し、培養ラット骨
髄間葉系幹細胞を 3 次元培養する。作
成は microsphere 同様に water in oil
in water の double emulsion 法を用い
て行う。同時に走化因子を含有する
microsphere を足場に導入し走化因子
放出試験並びに細胞毒性試験を行う。
water in oil in water の sonication
の段階で強度を変化させ孔の大きさに
変化をつける。

4 研究成果

- (1) 幹細胞の遊走能は IL-8 と PDGF で有意
に増加した (図 1)。PDGF は PDGF-BB で
最も高い遊走能を示した (図 2)。IL-8
と PDGF の組み合わせでは PDGF の影響が
強く PDGF を増加させることで遊走能は
濃度依存性に高くなった (図 3)。一方、
AEA と capsaicin は細胞死をもたらすこ
とがわかった。特に AEA の細胞障害作用
が強かった (図 4)。AEA の細胞障害作用
は幹細胞だけではなく、血管内皮細胞に
おいても同様の効果が見られた。



(2) PLGA microsphere にまず、BSA を組み込み放出実験を行い、BSA の累積放出量と形態的变化を追った。BSA 放出は 10 日まで急激な放出が見られたが、その後は緩徐な放出であった。しかし、35 日には再び急激な放出の増加を認めた(図 5)。形態の変化は日を迫うごとに microsphere が膨張し、4 週目頃から一部が破裂した形態となった。放出の程度からプラトー期に放出される量は pg レベルとなる可能性があり、この時期に強力な遊走能を発揮させるためには microsphere への初期導入量は mg レベルが必要であると考えられる。microsphere が破裂することにより内部の BSA が放出されるため急激な増加となると考えられる (図 6)。



- (3) PLGA を用いて scaffold を作成した。細胞が接着するための pore サイズは概ね良好であったが、幹細胞を播種すると数時間で細胞死へと至った。細胞死の原因としては作成段階で使用するイソプロパノールが大量に残存しており、それにより細胞毒性が現れたと考えられたため、凍結乾燥後に十分な時間をかけて洗浄を行うことで細胞死は徐々に改善していった。しかし、細胞の3次元培養には至っていない。Scaffold 内での3次元細胞培養を可能にするためには、重力の影響を考慮しないといけないと考えられた。Scaffold へ浸透させた細胞は scaffold へ接着する前にすり抜けて下の方へ堆積していった。重力の影響を排除するためには rotary cell culture system などを用いる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) YASUNORI MISHIMA, The protective effect of propofol against exposure to anandamide in endothelial cells. 2012 Annual Meeting of the International Anesthesia Research Society
2012年5月18日～2012年5月21日
ボストン 米国

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 貴彦 (ITO TAKAHIKO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20309842

(2) 研究分担者

三島 康典 (MISHIMA YASUNORI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30258470

伊藤 明日香 (ITO ASUKA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20412538

亀山 直光 (KAMEYAMA NAOMITSU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80529511